络石藤与地瓜藤抑制 NO 活性及差异性化学成分研究

黄梓泓[1]，宋鸿志[1]，Edward J Kennelly[2]，谭钦刚[1,2*]
(1. 桂林医学院， 桂林 541199；2. 纽约城市大学，美国 纽约 10468)

摘要: 络石藤为药典记载的常用中药，地瓜藤在民间部分地区用作络石藤，为明确两种药材抗炎活性及相关化学成分间的差异，初步探讨其可能的药效物质基础，该研究通过检测不同浓度络石藤与地瓜藤醇提物对 RAW 264.7 细胞存活率的影响，Griess 试剂法测定 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞上清液 NO 释放量，利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对络石藤与地瓜藤醇提物中的化学成分进行分析，结合多元统计学中的 OPLS-DA 模型鉴定两种药材的差异性化学成分。结果表明：（1）两种药材皆具一定的 NO 抑制作用，络石藤粗提物的抑制作用稍强于地瓜藤。（2）络石藤与地瓜藤的化学成分存在明显差异，络石藤中的 21 个差异性成分主要为木脂素类，地瓜藤中的 10 个差异性成分主要为黄酮类。上述差异性化学成分可能是造成两种药材抗炎活性差异的主要活性物质，该研究为络石藤与地瓜藤的抗炎药效物质基础、质量控制提供了理论依据。

关键词: 络石藤，地瓜藤，NO 抑制，UPLC-Q-TOF-MS/MS，差异性成分

Study on the NO inhibition and the differential chemical constituents of *Trachelospermum jasminoides* and *Ficus tikoua*

HUANG Zihong[1], SONG Hongzhi[1], Edward J Kennelly[2], TAN Qingang[1,2*]
(1. *Guilin Medical University,* Guilin 541199, Guangxi, China; 2. *City University of New York*, New York 10468, USA*)*

Abstract: *Trachelospermum jaminoides*, a liana of family Apocynaceae, is a classic traditional Chinese medicine recorded in the Chinese Pharmacopoeia, and *Ficus tikoua*, a liana of family Moraceae, is used as its customary supply in some ethnic districts, both of which are used as remedies for the inflammation-related disease. In order to determine the differences of anti-inflammatory activity and related chemical constituents between the two medicinal materials, the cell viability test was used to detect the cytotoxicity of *T. jaminoides* and *F. tikoua* at different concentrations, and the Griess method was applied to detect the inhibitory effects of the two species on nitric oxide (NO) production in LPS-induced RAW 264.7 cells *in vitro*. The ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) combined with the OPLS-DA model in multivariate statistics were used to identify the differential chemical constituents between *T. jaminoides* and *F. tikoua.* The results were as follows: (1) The NO production inhibition rate of *T. jaminoides* is stronger than that of *F. tikoua*. (2) Twenty-one differential chemical components were identified in *T. jaminoides,* most of which are lignans. Ten differential chemical components in *F. tikoua*, most flavonoids, were identified. It makes sense that *F. tikoua* used as a customary supply for *T. jaminoides*, but the chemical substances which showed anti-inflammatory activity are much different. This study clarifies the chemical differences between the two species, and provides new insights and references for the quality control of the herbal drugs.

Key words: *Trachelospermum jaminoides*, *Ficus tikoua*, NO inhibition, UPLC-Q-TOF- MS/MS, differential chemical constituents

基金项目：国家自然科学基金项目（82060783）；广西自然科学基金项目（2020GXNSFAA259001）[Supported by National Natural Science Foundation of China（82060783）；Guangxi Natural Science Foundation（2020GXNSFAA259001）]。

第一作者：黄梓泓（1997–），硕士生，主要从事中药功效物质基础研究，（E-mail）289340305@qq.com 。
*__通信作者__：谭钦刚，博士，教授，主要从事天然药物化学研究，（E-mail）qgtan@glmc.edu.cn。

络石藤作为常见中药，在我国具有悠久的应用历史，始载于《神农本草经》，被列为上品。2020 年版《中华人民共和国药典》中记载其为夹竹桃科植物络石（*Trachelospermum jasminoides*）的干燥带叶藤茎（国家药典委员会，2020）。络石藤主要含木脂素类、三萜类等化学成分，具有抗炎镇痛、抗肿瘤、抗病毒等作用，民间主要用于治疗风湿热痹、腰膝酸痛等症，现代临床广泛用于与炎症和疼痛相关的疾病，如关节炎、类风湿性关节炎等（李金生等，2016；Zhao et al., 2017）。因民族用药习惯不同，桑科榕属植物地瓜（*Ficus tikoua*）的新鲜或干燥地上部分—地瓜藤在不同地区用作络石藤（宫璐等，2016），该植物主要含黄酮类、酚酸类及萜类等化学成分，具有抗菌、抗氧化、抗炎和抗肿瘤等活性，主要用于清热利湿、活血通络、解毒消肿等（周芹茹等，2020；杨烨等，2021；Yao et al., 2022）。上述两种药材在科属来源、化学成分及临床应用方面存在差异，其抗炎活性及相应的化学成分差异尚未明确。中药材化学成分研究是阐明中药材药效物质、作用机制以及临床疗效的先决条件（郑敏霞等，2011；汪小莉等，2018），传统分离方法费时费力且需消耗大量药材，利用现代技术如超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术可为不同样品间化学成分差异及品质评价提供参考，如 Da Silva 等（2017）通过该法结合多元统计学鉴定了两大瓜拉纳产区由于地理条件不同而导致的差异性成分。络石藤与地瓜藤在性状上难以鉴别，两者皆有治疗炎症相关疾病的记载，为初步探究两种药材抗炎活性及相关化学成分的差异，本研究利用脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的体外细胞模型探究络石藤与地瓜藤对炎症因子一氧化氮（nitric oxide，NO）的抑制活性差异，采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合偏最小二乘法分析法（OPLS-DA），对络石藤和地瓜藤的差异性成分进行分析，进而为络石藤与地瓜藤的药效物质基础研究及质量控制提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 药材与试剂

本实验所需药材于 2019 年 12 月采自广西壮族自治区，络石藤采自金秀县，地瓜藤采自阳朔县。样品经广西壮族自治区中国科学院广西植物所黄俞淞副研究员鉴定为络石藤与地瓜藤的带叶藤茎。质谱纯乙腈、甲醇、水和甲酸（美国 Honeywell 公司）；DMEM 高糖培养基、胎牛血清（美国 Gibco 公司）；脂多糖(美国 Sigma-Aldrich 公司）；3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 MTT、二甲基亚砜 DMSO、吲哚美辛 Indomethacin（北京索莱宝科技有限公司）；一氧化氮测定试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）。

1.2 仪器

UPLC-Q-TOF-MS/MS 系统（美国 Waters 公司）：包括 ACQUITY UPLC 液相色谱仪，Xevo G2-S Q-TOF 质谱仪，配有 Lockspray 接口及电喷雾离子源（ESI）等；数据的采集和处理采用 MassLynx 4.1 质谱工作站；ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司)；S30H-D78224 型超声清洗器（德国 Elma Sonic 公司）；AL204 型分析天平（瑞士 Mettler toledo 公司）；3111 型 CO_2 培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；AC2-4S1 生物安全柜（新加坡 ESCO 公司）；Infinite M200 PRO 多功能酶标仪（瑞士 TECAN 公司）。

1.3 细胞

RAW 264.7 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法

2.1 体外 NO 抑制活性测试

2.1.1 供试品溶液的制备 分别取络石藤及地瓜藤各 0.2 g，置于 20 mL 80%甲醇-水溶液中室温下超声提取 2 次，每次 20 min，合并提取液静置 30 min，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得各样品甲醇提取物。

2.1.2 细胞及培养 RAW 264.7 细胞加入 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)中，置于 5% CO_2、37 ℃细胞培养箱中培养 1~2 d。当细胞密度达到 80%~90%时按照 1∶2 比例传代。

2.1.3 络石藤和地瓜藤醇提物对 RAW 264.7 细胞的毒性考察 将 RAW 264.7 细胞配置成浓度为 $6×10^4$ 个/ mL 的细胞悬液，每孔 100 μL 接种于 96 孔板上，放入 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中 24 h，设置对照组(仅含培养基)，给药组(含不同浓度络石藤醇提物、地瓜藤醇提物)，每组 3 个重复孔。于 24 h 后，除去孔内培养基，每孔添加 100 μL 含有 0.5 $mg·mL^{-1}$ MTT 的培养基，孵箱中培养 4 h 后弃去培养基，每个孔中添加 100 μL 二甲基亚砜。在酶标仪 490 nm 波长下测量吸收波长。

计算细胞存活率：细胞存活率＝($A_{给药}/A_{对照}$)×100%

2.1.4 NO 释放量的检测 将 RAW 264.7 细胞配置成浓度为 $1.5×10^5$ 个/mL 的细胞悬液，每孔 100 μL 接种于 96 孔

板上，放入 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中 12 h，设置空白对照组(仅含培养基)，LPS 模型组(含 2 μg·mL^{-1} LPS)和给药组(2 μg·mL^{-1} LPS、LPS+吲哚美辛、LPS+不同浓度络石藤醇提物和 LPS+不同浓度地瓜藤醇提物)，每组设置 3 个重复孔。于 24 h 后，收集上清液采用 Griess 法测定 NO 含量，用酶标仪检测 540 nm 下的吸光度。

2.1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据之间比较采用单因素方差分析，P<0.05 为差异有统计学意义。

2.2 差异成分分析处理方法

2.2.1 色谱检测条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm × 100 mm,1.7 μm），采用 0.5 mL·min^{-1} 的流速进行洗脱，进样体积设定为 1 μL，样品浓度为 2 mg·mL^{-1}。流动相由含有 0.1%甲酸水溶液（A）-乙腈（B）组成，洗脱程序如下：0~1.00 min 5%~18% B；1.00~2.50 min 18%~20% B；2.50~4.50 min 20%~25% B；4.50~5.00 min 25%~70% B；5.00~7.00 min 70%~75% B；7.00~9.50 min 75%~98% B；9.50~11.50 min 98%~5% B；11.50~13.50 min 5% B。

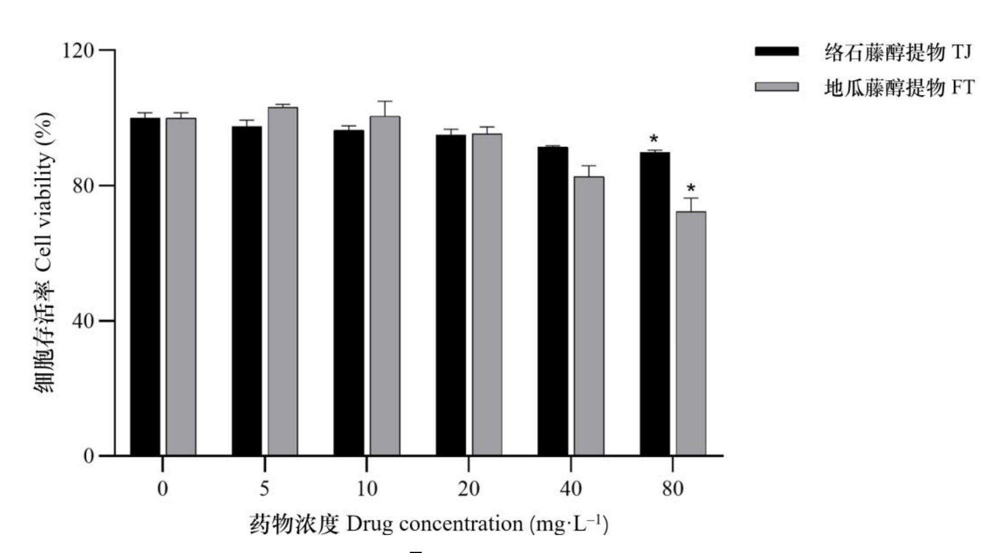
2.2.2 质谱检测条件 质谱仪通过电喷雾电离（ESI）源连接到 UPLC 系统，雾化气为氮气，质量扫描范围 m/z 100~1500，累积时间 0.2 s。毛细管电压在负离子模式下为 2.42 kV，在正离子模式下为 3.00 kV，样品锥电压为 25 V，提取锥电压为 4 V。对于 MS/MS 谱图，优化了不同的碰撞能量（20-50 eV），以实现结构解析的最大特征片段数。氮气用于雾化器和去溶剂化，去溶剂化和锥形气体流速分别为 800 和 20 L·h^{-1}，去溶剂化温度为 550 °C，源温度为 120 °C。数据的采集和处理软件为 MassLynx 4.1 质谱工作站。

2.2.3 OPLS-DA 差异性成分分析 以 UPLC-Q-TOF-MS/MS 采集所得络石藤和地瓜藤色谱图中峰面积量化值为变量，采用 SIMCA14.1 软件进行 OPLS-DA 分析，络石藤和地瓜藤样品呈现一定分类聚集现象。OPLS-DA 模型中变量投影重要度（VIP 值）越大，表明该指标对区分络石藤和地瓜藤的贡献越大(崔婷等，2022)，即可能是区分两种药材的差异性成分，确定络石藤与地瓜藤间的差异性化学成分。利用 MassLynx 4.1 色谱工作站得到化合物的精确相对分子质量及化合物碎片信息，参照对照品并查阅相关文献（范明松等，2005；袁珊琴等，2010；景玲等，2012；Liu et al, 2015; Zhao et al, 2017; Zhou et al, 2018; Murugesu et al, 2021; Song et al, 2022; Yao et al., 2022）结合 Progenesis QI 软件，鉴定络石藤与地瓜藤的差异性成分。

3 结果

3.1 络石藤和地瓜藤醇提物对 RAW 264.7 细胞活力的影响

与对照组比较，络石藤醇提物（ethanol extract of *Trachelospermum jasminoides*，TJ）和地瓜藤醇提物（ethanol extract of *Ficus tikoua*，FT）质量浓度在 80 mg·L^{-1} 时对细胞增殖有明显的抑制作用，质量浓度小于 80 mg·L^{-1} 的各给药组对细胞增殖无明显抑制作用，结果见图 1。以无毒质量浓度设计 40、20、10 mg·L^{-1} 为高、中、低剂量进行下一步实验。



注：($\bar{x} \pm s$，n = 3)，与对照组比较，$^*P < 0.05$。Note: ($\bar{x} \pm s$，n = 3), compared with the control group, $^*P < 0.05$.

图 1 络石藤和地瓜藤醇提物对 RAW 264.7 细胞的毒性影响

Fig.1 Cytotoxicity of ethanol extracts of *Trachelospermum jasminoides* and *Ficus tikoua* to RAW264.7 cells

3.2 络石藤和地瓜藤醇提物对 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞释放 NO 的影响

实验结果显示，络石藤和地瓜藤醇提物均可一定程度抑制 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞释放 NO 炎症因子，且各组的药效呈现浓度依赖性。络石藤醇提物的 NO 释放抑制作用稍强于地瓜藤醇提物，结果见表 1。

表 1 络石藤和地瓜藤醇提物对 RAW 264.7 分泌 NO 的影响

Table 1 Effects of ethanol extracts of *Trachelospermum jasminoides* and *Ficus tikoua* on NO secretion by RAW 264.7

组别 Group	浓度 Concentration（$mg·L^{-1}$）	NO 释放量 NO production（$\mu mol·L^{-1}$）
空白对照 Blank control	-	11.00 ± 1.00
模型对照 Model control	-	$17.07 \pm 1.67^{\#\#}$
吲哚美辛+LPS Indomethacin + LPS	-	$13.13 \pm 0.11^{**}$
络石藤醇提物+LPS TJ+LPS	40	$14.70 \pm 0.14^{**}$
	20	$15.08 \pm 0.23^{**}$
	10	$15.65 \pm 0.08^{*}$
地瓜藤醇提物+LPS FT+LPS	40	$15.02 \pm 0.18^{**}$
	20	$15.73 \pm 0.14^{*}$
	10	16.27 ± 0.15

注：与空白对照比较，$^{\#\#}P < 0.01$，与模型对照比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note: Compared with the blank control, $^{\#\#}P < 0.01$, compared with the model control, $^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

3.3 络石藤与地瓜藤差异性成分鉴定

OPLS-DA 分析结果表明模型对 X 变量的可解释性 R^2X 为 0.84，模型对 Y 变量的可解释性 R^2Y 为 0.999，模型预测能力 Q^2 为 0.993，说明对模型的评估良好。通过得分图（图 2）可以看出络石藤和地瓜藤醇提物样品数据点区分明显，表明络石藤在化学成分上与地瓜藤有明显区别。按该模型 X 变量对 Y 变量的解释能力（Variable influence on projection，VIP）大小进行排序，从采集所得络石藤和地瓜藤色谱图（图 3）中共鉴定出络石藤中 21 个显著差异性成分（表 2）。包括木脂素类 10 个、苯丙酸类 4 个、黄酮类 2 个、三萜类 2 个、其他类 3 个。地瓜藤中 10 个显著差异性成分（表 3），包括黄酮类 7 个、木脂素类 1 个、苯丙酸类 1 个、三萜类 1 个。

3.3.1 木脂素类化合物分析

在负离子模式下，表 2 中化合物 **1-4** 的准分子离子峰为 *m/z* 697.236 1 $[M-H]^-$，去除两分子葡萄糖残基(-162 Da*2)后得到碎片离子 *m/z* 373.127 3，接着从内酯环上连接两个取代基的季碳上断裂取代基（-16 Da-136 Da）（Abe et al,1986; Liu et al, 2015）后得到碎片离子 *m/z* 221.068 2。随后内酯环上丢失一分子 CO（-28 Da）后，环内形成双键（-2 Da），得到碎片离子 *m/z* 191.056 0，结合文献（Liu et al, 2015）及质谱断裂方式，推测该化合物为去甲络石苷元 4,4'-di-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷。化合物 **1-7** 与 **1-8** 以及化合物 **1-12** 与 **1-13** 为两对同分异构体，而同分异构体其保留时间接近且裂解途径无明显差别。在负离子模式下，化合物 **1-13** 的准分子离子峰为 *m/z* 595.204 3 $[M+HCOO]^-$，去除一分子葡萄糖残基（-162 Da）后得到碎片离子 *m/z* 387.144 1，紧接着丢失一分子-OCH_3 得到碎片离子 *m/z* 357.133 9，因此可以推测出化合物的结构间母核上的区别。继而可推测化合物 **1-4**、**1-7** 和 **1-8** 的母核皆为去甲络石苷元，化合物 **1-12** 与 **1-13** 的母核为络石苷元。同时结合保留时间与文献上的报道对应（Liu et al, 2015），可以推测出化合物 **1-7** 与 **1-8** 为去甲络石苷元 **5'**-*C*-*β*-葡萄糖苷和去甲络石苷，化合物 **1-12** 与 **1-13** 分别为 5'-甲氧基罗汉松脂苷和络石苷。

3.3.2 苯丙酸类化合物分析

苯丙酸类化合物由于结构中含有羧基和酚羟基，其裂解过程中易丢失水分子和羧酸分子，且易在羰基处断裂形成碎片离子。化合物 **1-1** 及 **1-2** 在负离子模式下，二者的准分子离子峰在 *m/ z* 353.088 1[M-H]$^-$左右，可推测二者的分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$，它们在二级质谱裂解过程中由于酯键断裂形成 *m/z* 191.055 4、179.025 3，分别对应于奎宁酸片段、咖啡酸片段（雒晓梅等，2019）。根据文献（Qi et al, 2009）报道的保留时间判断他们分别为绿原酸及隐绿原酸。

3.3.3 黄酮类化合物

黄酮苷类化合物的裂解通常为糖链结构的连续丢失，如鼠李糖（146 Da）或葡萄糖（162 Da）残基的丢失，从而可以找到黄酮苷元的碎片离子峰。化合物 **1-6** 的准分子离子峰为 *m/z* 447.092 1 [M-H]$^-$，去除一分子葡萄糖残基(-162 Da)后得到碎片离子 *m/z* 285.039 5，结合文献报道（徐萌伶等, 2022）推测其为木犀草苷。且黄酮类化合物裂解过程中易发生脱水、环的逆狄尔斯-阿尔德反应（RDA）裂解，以及失去 CO，CHO 等一些中性分子。由于二级质谱中存在 *m/z* 285.040 0 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$]$^-$等碎片离子，根据（Qian et al, 2007）可推测化合物 **1-5** 为忍冬苷。

3.3.4 三萜类化合物

通常三萜类化合物在二级质谱裂解过程中，主要是糖键的连续性断裂以及取代基的丢失。化合物 **1-14** 的准分子离子峰为 *m/z* 727.394 1 [M+COOH]$^-$，分子去除一个葡萄糖残基(-162 Da)后得到碎片离子 *m/z* 519.332 6，结合分子量及文献（谭兴起等，2006）推测其为络石苷 B1。化合物 **1-16** 的准分子离子峰为 *m/z* 695.364 2 [M-H]$^-$，去除一分子葡萄糖残基 (-162 Da) 后得到碎片离子 *m/z* 517.317 0，随后丢失了一分子羧基及羟基(-45 Da-17 Da）从而得到碎片离子 *m/z* 471.310 5，结合分子量及文献报道推测其为络石苷 F（谭兴起等，2006）。

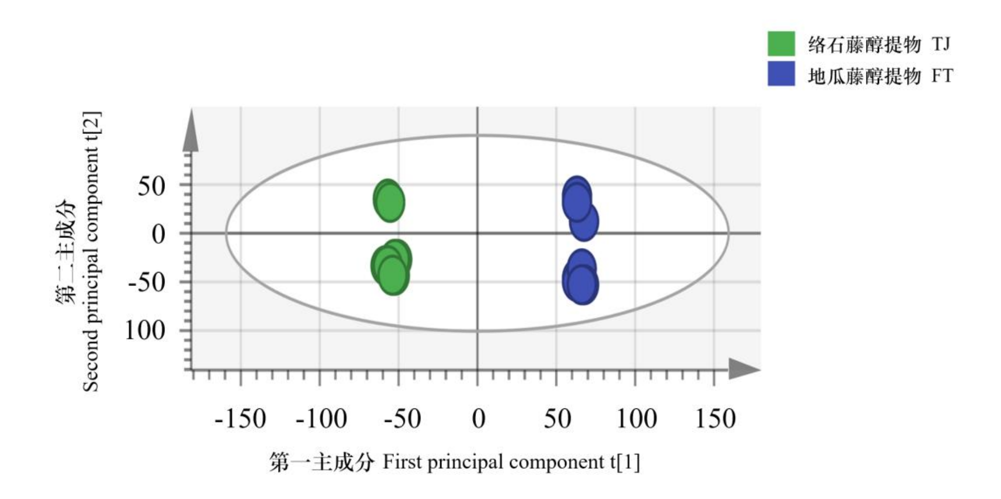


图 2 OPLS-DA 分析的得分图

Fig.2 Score chart of OPLS-DA analysis

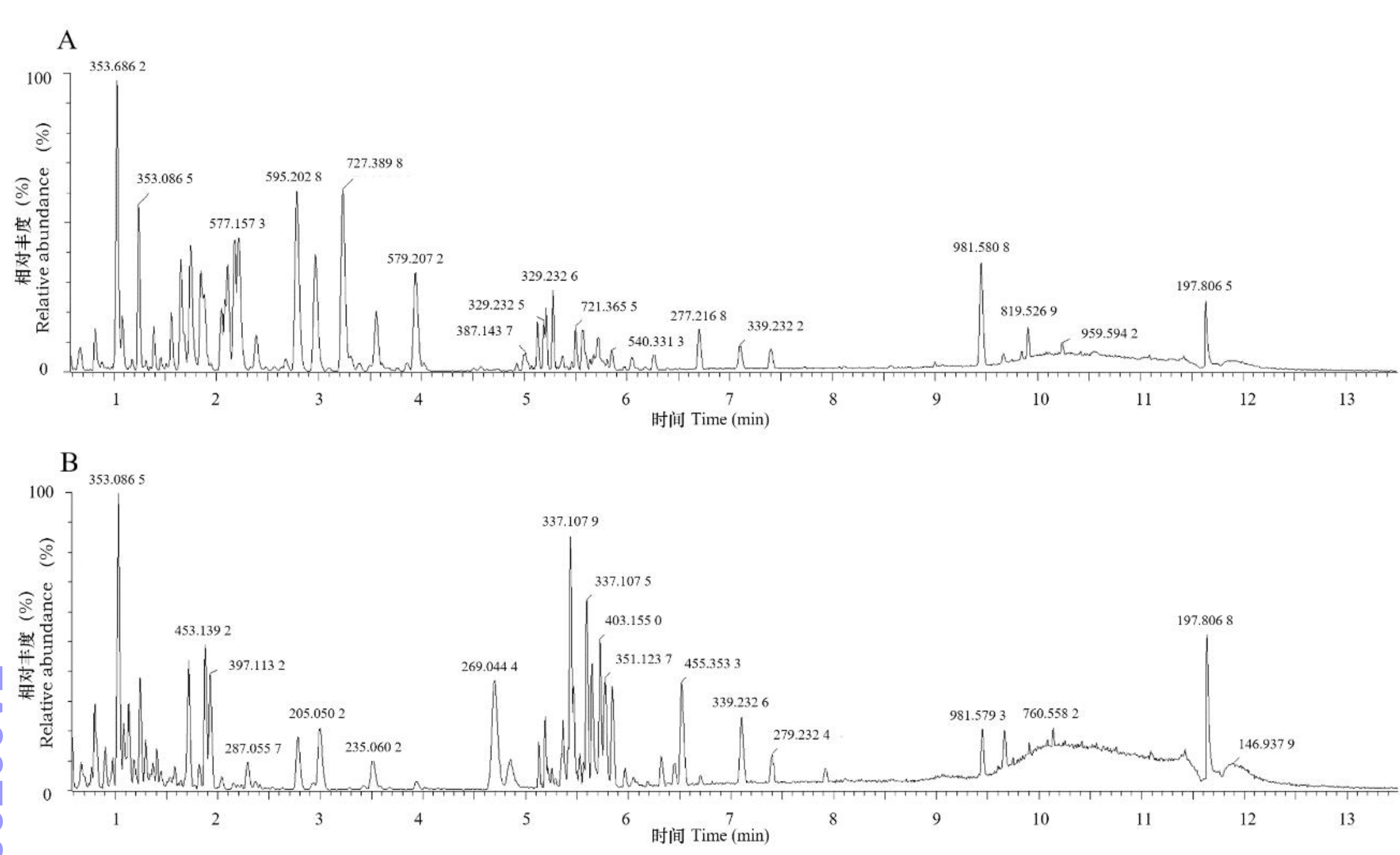


图 3 络石藤(A)和地瓜藤(B)的 BPI 色谱图

Fig. 3 Base peak chromatograms of *Trachelospermum jasminoides*(A) and *Ficus tikoua*(B)

表 2 络石藤的差异性化学成分鉴定

Table 2 Identification of differential chemical composition from *Trachelospermum jasminoides*

序号 No.	保留时间 t_R(min)	准分子离子峰 Quasimolecular ion (*m/z*)	主要离子碎片 Main fragment ions	分子式 Molecular formula	成分名称 Compounds	类型 Type
1-1	1.05	353.088 1	191.055 4 179.025 3 173.035 7	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸 Chlorogenic acid	苯丙酸类 Phenylpropanoids
1-2	1.25	353.087 7	191.055 1 179.034 4 173.044 3	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	苯丙酸类 Phenylpropanoids
1-3	1.40	367.104 5	191.055 5 173.043 9 135.042 3	$C_{17}H_{20}O_9$	绿原酸甲酯 Methyl chlorogenate	苯丙酸类 Phenylpropanoids

1-4	1.56	697.236 1	373.127 3 221.068 2 191.056 0	$C_{32}H_{42}O_{17}$	去甲络石苷元 4,4',-di-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷 Nortrachelogenin 4,4'-di-*O*-*β*-D-glucopyranoside	木脂素类 Lignans
1-5	1.67	593.152 3	285.040 0	$C_{27}H_{30}O_{15}$	忍冬苷 Luteolin 7-*β*-neohesperidoside	黄酮类 Flavonoids
1-6	1.76	447.092 1	285.039 5 284.031 7	$C_{21}H_{20}O_{11}$	木犀草苷 Luteolin 7-*O*-glucopyranoside	黄酮类 Flavonoids
1-7	1.85	535.182 3	373.128 2 355.120 5	$C_{26}H_{32}O_{12}$	去甲络石苷元-8'-O-*β*-葡萄糖苷 Nortrachelogenin-8'-O-*β*-glucoside	木脂素类 Lignans
1-8	1.88	581.186 5	373.128 2 355.120 5 179.070 6	$C_{26}H_{32}O_{12}$	去甲络石苷 Nortracheloside	木脂素类 Lignans
1-9	2.11	681.240 1	357.132 5	$C_{32}H_{42}O_{16}$	罗汉松树脂酚-4'-*O*-*β*-龙胆二糖苷 Matairesinol-4'-*O*-*β*-gentiobioside	木脂素类 Lignans
1-10	2.18	711.251 1	387.143 1 129.091 2	$C_{33}H_{44}O_{17}$	络石苷元-4'-*O*-*β*-龙胆二糖苷 Trachelogenin 4'-*O*-*β*-gentiobioside	木脂素类 Lignans
1-11	2.39	515.118 0	353.087 3 191.054 9 179.033 9	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 C isochlorogenic acid C	苯丙酸类 Phenylpropanoids
1-12	2.67	549.198 7	387.146 5 357.135 1	$C_{27}H_{34}O_{12}$	5'-甲氧基罗汉松脂苷 5'-Methoxymatairesinoside	木脂素类 Lignans
1-13	2.79	595.204 3	387.144 1 357.133 9	$C_{27}H_{34}O_{12}$	络石苷 Tracheloside	木脂素类 Lignans
1-14	3.23	727.394 1	681.386 3 519.332 6	$C_{36}H_{58}O_{12}$	络石苷 B1 Trachelosperoside B1	三萜类 Triterpenoids
1-15	3.39	373.128 1	327.123 7 179.070 6	$C_{20}H_{22}O_{7}$	去甲络石苷元 Nortrachelogenin	木脂素类 Lignans
1-16	3.56	695.364 2	533.310 4 471.310 5	$C_{36}H_{56}O_{13}$	络石苷 F Trachelosperoside F	三萜类 Triterpenoids
1-17	3.94	579.208 4	373.129 4 371.148 7	$C_{28}H_{36}O_{13}$	(8*S*,8'*S*)-8'-Hydroxy-3,3',4,5-tertramethoxylignan-9,9'-olide-4'-*O*-*β*-D-glucopyranoside	木脂素类 Lignans
1-18	5.01	387.144 0	357.133 2 193.086 5	$C_{21}H_{24}O_{7}$	络石苷元 Trachelogenin	木脂素类 Lignans
1-19	5.19	329.232 7	229.143 8 211.132 3 171.102 1	$C_{18}H_{34}O_{5}$	9,12,13-三羟基-10-十八烯酸 9,12,13-Trihydroxy-10-octadecenoic acid	其他类 Others

1-20	5.21	327.216 6	211.133 7 171.101 7	$C_{18}H_{32}O_5$	9 *S*,12*S*,13*S* -三羟基-10*E*,15*Z*-十八烯酸 9*S*,12*S*,13*S*-Trihydroxy-10*E*,15*Z*-octadecadienoic acid	其他类 Others
1-21	5.28	329.232 7	201.112 9 171.102 4	$C_{18}H_{34}O_5$	9,10,13-三羟基-11*E*-十八烯酸 9,10,13-Trihydroxy-11*E* octadecenoic acid	其他类 Others

表 3 地瓜藤的差异性化学成分鉴定

Table 3 Identification of differential chemical composition from *Ficus tikoua*

序号 No.	保留时间 t_R(min)	准分子离子峰 Quasimolecular ion (*m*/*z*)	主要离子碎片 Main fragment ions	分子式 Molecular formula	成分名称 Compounds	类型 Type
2-1	0.80	447.114 3	285.023 8 151.011 0	$C_{21}H_{20}O_{11}$	山奈酚 3-*O*-*β*-D-吡啶葡萄糖苷 Kaempferol 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside	黄酮类 Flavonoids
2-2	1.06	417.103 4	341.087 5 191.053 1	$C_{22}H_{26}O_8$	丁香脂素 Syringaresinol	木脂素类 Lignans
2-3	1.14	577.134 3	407.076 5 289.071 3	$C_{30}H_{26}O_{12}$	原花青素 B Procyanidin B	苯丙酸类 Phenylpropanoids
2-4	1.72	367.102 2	205.049 5 161.059 8	$C_{21}H_{20}O_6$	Schliebenone A	黄酮类 Flavonoids
2-5	4.69	269.044 5	239.036 1 133.032 5	$C_{15}H_{10}O_5$	染料木素 Genistein	黄酮类 Flavonoids
2-6	5.43	337.107 7	293.046 1 282.052 0	$C_{20}H_{18}O_5$	3′-二甲基烯丙基染料木黄酮 Isowightenon	黄酮类 Flavonoids
2-7	5.46	339.123 2	311.169 7 219.065 5 135.044 9	$C_{20}H_{20}O_5$	8-异戊烯基柚皮素 8-Prenylnaringenin	黄酮类 Flavonoids
2-8	5.60	337.107 6	297.150 1 119.049 3	$C_{20}H_{18}O_5$	怀特酮 Wighteone	黄酮类 Flavonoids

2-9	5.78	351.122 8	321.077 5 307.061 2 293.044 8	$C_{20}H_{16}O_6$	Hydroxyalpinumisoflavone	黄酮类 Flavonoids
2-10	6.52	455.352 2	441.255 4 415.222 0	$C_{30}H_{48}O_3$	齐墩果酸 Oleanolic acid	三萜类 Triterpenoids

4 讨论与结论

络石藤是药典中记载的我国常用且重要的中药材，由于其产地和用药习惯的不同，地瓜藤在民间常用作络石藤替代品。本实验通过比较络石藤与地瓜藤醇提物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量的影响，发现络石藤与地瓜藤皆可抑制该炎症因子释放，这初步解释了地瓜藤可在部分地区长期用作络石藤的合理性。

本研究通过 OPLS-DA 法证实络石藤与地瓜藤的化学成分存在明显差异，络石藤以二苄基丁内酯类木脂素类成分为主要差异性成分（表 2），而地瓜藤则以黄酮类化合物居多（表 3），两类物质均报道具有抗炎活性。二苄基丁内酯类木脂素类成分具有抗炎、抗肿瘤以及平喘等多种作用（毛杰等，2014），其代表性成分络石苷为药典中评价络石藤药材质量的主要指标（国家药典委员会，2020）；牛蒡子苷元通过抑制转录因子 p65 的核移位等途径，降低了诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达，进一步减少了 NO 的生产，从而起到抗炎作用（Cho et al, 2002）；Lee 等（2010）发现牛蒡子苷和罗汉松脂酚不仅抑制核转录因子 NF-κB 及其调节蛋白的激活，而且能够潜在地抑制特异性丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）的激活，从而降低炎症因子 iNOS 与 COX-2 的表达；Song 等（2022）发现多个二苄基丁内酯类木脂素成分能抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 中 NO 的产生。刘美平等（2010）通过紫外分光光度法发现络石藤提取物中的总木脂素含量超过 80%，证明该类成分为络石藤的主要化学成分。地瓜藤中的差异性黄酮类成分如染料木素可降低 LPS 诱导的炎症小鼠的炎症因子表达（Chen et al, 2018）；怀特酮具有显著的 NO 抑制作用（Tuan Anh et al., 2016）；8-异戊烯基柚皮素可降低体外炎症模型的炎症因子表达（Paoletti et al., 2009）等。此外，Yao 等（2021）从地瓜藤的同属植物高山榕果实中分离得到的黄酮类化合物也具有抑制 NO 的作用。

本研究应用体外细胞实验观察络石藤与地瓜藤的 NO 抑制活性差异，发现络石藤对 NO 释放的抑制作用稍优于地瓜藤，利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术并结合 OPLS-DA 方法，发现络石藤和地瓜藤的主要差异性成分分别是木脂素和黄酮，根据相关文献报道，推测上述两类成分分别为两种药材抗炎活性的主要药效物质基础。研究结果为络石藤与地瓜藤的质量控制，进一步合理开发利用植物资源提供了理论依据。

参考文献：

ABE F, YAMAUCHI T, 1986. Lignans from *Trachelospermum asiaticum* (Tracheolospermum. II) [J]. Chem Pharm Bull, 34(10): 4340-4345.

CHEN XQ, TAN JY, YANG MQ, et al., 2018. Genistein has the function of alleviating and treating disseminated intravascular coagulation caused by lipopolysaccharide [J]. J Nat Med, 72(4): 846-856.

CHO MK, PARK JW, JANG YP, et al., 2002. Potent inhibition of lipopolysaccharide inducible nitric oxide synthase expression by dibenzylbutyrolactone lignans through inhibition of I-κBα phosphorylation and of p65 nuclear translocation in macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2(1): 105-116.

CUI T, LI WY, WEN S, et al., 2022. Comprehensive quality evaluation of Fructus Alpiniae Oxyphyllae from different producing areas based on OPLS-DA combined with entropy weight TOPSIS method [J]. Mod Chin Med, 24(8): 1561-1567. [崔婷，李焐仪，文珊，等，2022. 基于 OPLS-DA 结合熵权 TOPSIS 的不同产地益智仁综合质量评价 [J]. 中国现代中药，24(8)：1561-1567.]

DA SILVA GS, CANUTO K M, RIBEIRO P, et al., 2017. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics [J]. Food Res Int, 102: 700-709.

FAN MS, YE G, HUANG CG, 2005. The advances of chemistry and pharmacological study of *Ficus* genus [J]. Nat Prod Res Dev, 17(4): 497-504. [范明松，叶冠，黄成钢. 2005. 榕属植物化学成分和药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，17(4)：497-504.]

GONG L, HUANG ZH, ZHANG J, et al., 2016. Identification of traditional Chinese medicine *Trachelospermum jasminoides* and its customary supplies using DNA barcoding [J]. World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mat Med, 18(8): 1413-1418. [宫璐，黄志海，张靖，等，2016. 中药络石藤及其习用品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 世界科学技术-中医药现代化，18(8)：1413-1418.]

JING L, YU NJ, ZHAO YM, et al., 2012. Trace chemical constituents contained in *Trachelospermum jasminoides* and structure identification [J]. China J Chin Mat Med, 37(11): 1581-1585. [景玲，于能江，赵毅民，等，2012. 络石藤中微量化学成分的分离及结构鉴定 [J]. 中国中药杂志，37(11)：1581-1585.]

LEE JY, CHO BJ, PARK TW, et al., 2010. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Forsythia koreana* fruits attenuate lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthetase and cyclooxygenase-2 expressions through activation of nuclear factor-κB and mitogenactivated protein kinase in RAW264.7 cells [J]. Biol Pharm Bull, 33(11): 1847-1853.

LI JS, ZHANG Q, ZHANG T, et al., 2016. Research progress of traditional Chinese medicine of *Trachelospermum jasminoides* [J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol, 31(2): 55-58. [李金生，张茜，张涛，等，2016. 中药络石藤的研究进展 [J]. 河北中医药学报，31(2)：55-58.]

LIU MP, YU NJ, ZHAO J, et al., 2010. Quantitative analysis of total lignans in the lignan extract from *Trachelospermum jasminoides* by ultraviolet spectrophotometry [J]. Pharm J Chin PLA, 26(2): 162-164.[刘美平，于能江，赵骏，等，2010. 紫外分光光度法测定络石藤提取物中的总木脂素含量 [J]. 解放军药学学报，26(2)：162-164.]

LIU XT, WANG XG, YANG Y, et al., 2015. Qualitative and quantitative analysis of lignan constituents in Caulis Trachelospermi by HPLC-QTOF-MS and HPLC-UV [J]. Molecules, 20(5): 8107-8124.

LUO XM, SU MF, CHANG XY, et al., 2019. Qualitative and quantitative analysis of main chemical constituents in *Eucommia ulmoides* by LC-MS [J]. Mod Chin Med, 21(8): 1029-1040. [雒晓梅，宿美凤，常晓燕，等，2019. 基于 LC-MS 联用的杜仲主要化学成分定性及定量分析 [J]. 中国现代中药，21(8)：1029-1040.]

MAO J, YU NJ, YANG Y, et al., 2014. Biological activities of dibenzylbutyrolactone lignans: research advances [J]. J Int Pharm Res, 41(3): 275-281. [毛杰，于能江，杨郁，等，2014. 二苄基丁内酯类木脂素的生物活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，41(3)：275-281.]

MURUGESU S, SELAMAT J, PERUMAL V, 2021. Phytochemistry, pharmacological properties, and recent applications of *Ficus benghalensis* and *Ficus religiosa* [J]. Plants (Basel), 10(12): 2749.

NATIONAL PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol. I) [M]. Beijing: China Pharmaceutical Technology Press: 281. [国家药典委员会，2020. 中国药典(一部) [M]. 北京：中国医药科技出版社：281.]

PAOLETTI T, FALLARINI S, GUGLIESI F, et al., 2009. Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin [J]. Eur J Pharmacol, 620(1-3):120-130.

QI LW, CHEN CY, LI P, 2009. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos Lonicerae Japonicae by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 23(19): 3227-3242.

QIAN ZM, LI HJ, LI P, et al., 2007. Simultaneous quantification of seven bioactive components in Caulis Lonicerae Japonicae by high performance liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 21(6) :649.

SONG HZ, TAN JN, MA RJ, et al., 2022. Anti-inflammatory constituents from Caulis Trachelospermi [J]. Planta Med, 88(9-10): 721-728.

TAN XQ, CHEN HS, ZHOU M, et al., 2006. Triterpenoids from canes with leaves of *Trachelospermum jasminoides* [J]. Chin Tradit Herb Drug, 37(2): 171-174. [谭兴起，陈海生，周密，等，2006. 络石藤中的三萜类化合物 [J]. 中草药，37(2)：171-174.]

TUAN ANH HL, TUAN DT, TRANG DT, et al., 2017. Prenylated isoflavones from *Cudrania tricuspidata* inhibit NO production in RAW 264.7 macrophages and suppress HL-60 cells proliferation [J]. J Asian Nat Prod Res, 19(5): 510-518.

WANG XL, LIU X, HAN YQ, et al., 2018. Overview on main research method of effective material basis of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 49(4): 941-947. [汪小莉，刘晓，韩燕全，等，2018. 中药药效物质基础主要研究方法概述 [J]. 中草药，49(4)：941-947.]

XU ML, WANG YY, YU M, et al., 2022. Study on chemical components of aqueous extract from *Callicarpa nudiflora* by UPLC- Q- TOF- MS/MS [J]. Nat Prod Res Dev, 34(1): 42-49. [徐萌伶，王云云，郁萌，等，2022. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS 的裸花紫珠水提物化学成分分析 [J]. 天然产物研究与开发，34(1): 42-49.]

YANG Y, HE Q, HUANG Z, et al., 2021. Research on distribution of plant resources and its confusion of Miao medicine *Ficus tikoua* Bur [J]. J Med Pharm Chin Min, 27(11): 63-65. [杨烨，何琪，黄哲，等，2021. 苗药地瓜藤药材的植物资源分布及混淆品研究 [J]. 中国民族医药杂志，27(11)：63-65.]

YAO JM, WANG Z, WANG R, et al., 2021. Anti-proliferative and anti-inflammatory prenylated isoflavones and coumaronochromones from the fruits of *Ficus altissima* [J]. Bioorg Chem, 113: 104996.

YAO LL, ZHAO SC, LIU W, et al., 2022. Chemical constituents and biological activities of *Ficus tikoua* Bureau [J]. J Chem, 2022: 2423525.

YUAN SQ, YU NJ, ZHAO YM, et al., 2010. Chemical constituents from *Trachelosperomum jasminoides* [J]. Chin Tradit Herb Drug, 41(2): 179-181. [袁珊琴，于能江，赵毅民，等，2010. 络石藤化学成分的研究 [J]. 中草药，41(2)：179-181.]

ZHAO ZF, HE XR, ZHAO YH, et al., 2017. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of plants from the genus *Trachelospermum* L [J]. Molecules, 22(9): 1406.

ZHENG MX, CHEN Z, LIU P, et al., 2011. Analysis and identification of glycosides in *Paeonia lactiflora* by UPLC-MS /MS [J]. China J Chin Mat Med, 36(12): 1641-1643. [郑敏霞，陈喆，刘培，等，2011. 白芍中芍药苷及其衍生物的 UPLC-MS/MS 分析 [J]. 中国中药杂志，36(12)：1641-1643.]

ZHOU QR, LEI XY, LONG QD, et al., 2020. Chemical constituents of *Ficus tikoua* overground part. [J]. Chin Med Mat, 43(10): 2435-2438.[周芹茹，雷昕瑜，龙庆德，等，2020. 地果的化学成分研究 [J]. 中药材，43(10)：2435-2438.]

ZHOU SY, WANG R, DENG LQ, et al., 2018. A new isoflavanone from *Ficus tikoua* Bur [J]. Nat Prod Res, 32(21): 2516-2522.